



PATENT APPLICATION

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re application of

Docket No: Q76319

Yasuhiro KOUCHI, et al.

Appln. No.: Not Yet Assigned

Group Art Unit: Not Yet Assigned

Confirmation No.: Not Yet Assigned

Examiner: Not Yet Assigned

Filed: July 28, 2003

For: GENE ASSAY METHOD FOR PREDICTING GLAUCOMA ONSET RISK

SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENT

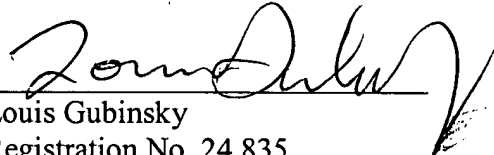
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

Submitted herewith is a certified copy of the priority document on which a claim to priority was made under 35 U.S.C. § 119. The Examiner is respectfully requested to acknowledge receipt of said priority document.

Respectfully submitted,

SUGHRUE MION, PLLC
Telephone: (202) 293-7060
Facsimile: (202) 293-7860


Louis Gubinsky
Registration No. 24,835

WASHINGTON OFFICE

23373

CUSTOMER NUMBER

Enclosures: JAPAN 2002-226612

Date: July 28, 2003

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日
Date of Application:

2002年 8月 2日

出 願 番 号
Application Number:

特願2002-226612

[ST.10/C]:

[JP2002-226612]

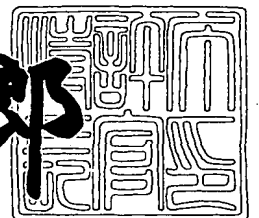
出 願 人
Applicant(s):

シスメックス株式会社

2003年 6月 6日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3044360

【書類名】 特許願

【整理番号】 NP02-1047

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/09

【発明者】

【住所又は居所】 神戸市中央区脇浜海岸通 1 丁目 5 番 1 号 シスメックス
株式会社内

【氏名】 高地 泰浩

【発明者】

【住所又は居所】 神戸市中央区脇浜海岸通 1 丁目 5 番 1 号 シスメックス
株式会社内

【氏名】 眞砂 明典

【発明者】

【住所又は居所】 神戸市中央区脇浜海岸通 1 丁目 5 番 1 号 シスメックス
株式会社内

【氏名】 高畑 隆之

【特許出願人】

【識別番号】 390014960

【氏名又は名称】 シスメックス株式会社

【代理人】

【識別番号】 100088904

【弁理士】

【氏名又は名称】 庄司 隆

【電話番号】 03-3864-6572

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 067070

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0200385

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 緑内障発症リスク判断のための遺伝子検査方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 緑内障関連遺伝子の遺伝子領域における少なくとも 1 箇所以上の塩基の変異を検出し、該変異を指標として将来の緑内障の発症を予測することを特徴とする遺伝子の検査方法。

【請求項 2】 緑内障関連遺伝子がオプティニューリン (OPTN) 遺伝子である請求項 1 に記載の検査方法。

【請求項 3】 遺伝子領域が配列番号 1 で示される塩基配列である請求項 1 または 2 に記載の検査方法。

【請求項 4】 配列番号 1 で示される塩基配列における 6 1 9 位の A から G への置換および／または 8 9 8 位の G から A への置換を検出する請求項 3 に記載の検査方法。

【請求項 5】 配列番号 1 で示される塩基配列における塩基の 1 以上の欠失を検出する請求項 3 に記載の検査方法。

【請求項 6】 配列番号 1 で示される塩基配列における塩基の 1 以上の挿入を検出する請求項 3 に記載の検査方法。

【請求項 7】 配列番号 1 で示される塩基配列における塩基の 2 以上の同時置換を検出する請求項 3 に記載の検査方法。

【請求項 8】 緑内障が原発性開放隅角緑内障および／または正常眼圧緑内障である請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 に記載の検査方法。

【請求項 9】 緑内障関連遺伝子の遺伝子領域の一部に特異的にハイブリッドを形成しうるオリゴヌクレオチドを用いて変異を検出することを特徴とする請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 に記載の検査方法。

【請求項 1 0】 緑内障関連遺伝子の遺伝子領域の一部に特異的にハイブリッドを形成しうるオリゴヌクレオチドが、以下に表される配列からなるオリゴヌクレオチドの群より少なくとも 1 以上選択され、プライマー機能を有するオリゴヌクレオチド；

1) 配列番号 1 5 から 4 0 のいずれかで表される塩基配列からなるオリゴヌクレ

オチド。

2) 前記 1) に記載のオリゴヌクレオチドの相補鎖。

3) 前記 1) または 2) に記載のオリゴヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズしうるオリゴヌクレオチド。

4) 前記 1) ～ 3) のいずれか 1 に記載のオリゴヌクレオチドと約 60% の相同性を有するオリゴヌクレオチド。

5) 前記 1) ～ 4) に記載のオリゴヌクレオチドのうち、1 ないし数個の塩基が置換、欠失、挿入もしくは付加といった変異された塩基配列を含むオリゴヌクレオチド。

【請求項 1 1】 請求項 9 に記載のオリゴヌクレオチドから選択される少なくとも 1 のオリゴヌクレオチドを用いて核酸増幅処理方法を行うことを含む請求項 8 に記載の検査方法。

【請求項 1 2】 請求項 1 ～ 9 または 1 1 のいずれか 1 に記載の検査方法に使用する試薬を含んでなる検査用試薬または検査用試薬キット。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、臨床検査の分野における緑内障関連遺伝子の検査方法および該遺伝子の変異を指標として緑内障発症リスクを予測するための検査方法に関する。例えば緑内障遺伝子として知られているオプティニューリン（以下「OPTN」という。）遺伝子の異常を検出し、該検出された異常、すなわち遺伝子の特定位置における塩基の変異を指標として緑内障を診断する遺伝子の検査方法、特に個体について将来発症する可能性を予知するための検査方法に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

緑内障は、目の中にある房水が排出されない状態となり、眼圧が上がって目の機能が落ちる疾患である。放置しておくと、見える範囲が狭まったり、視力が落ちたりして失明する。ただし、眼圧が正常にも関わらず、視神経に障害をきたす場合がある。

【 0 0 0 3 】

緑内障は、原発性開放隅角緑内障（P O A G）、正常眼圧緑内障（N T G）、原発性閉鎖隅角緑内障（P A C G）、先天性緑内障および続発性緑内障の5つの病態に分類され、緑内障の20%が遺伝性のものと言われている。これらのうち、最も多いのがP O A Gである。1988年から1989年にかけて社団法人日本眼科医会が実施した全国疫学調査によると、40歳以上の人口のうち3.56%が緑内障患者であると報告されている。

【 0 0 0 4 】

緑内障の主な危険因子は家族歴であり、その発症には遺伝子が関与していることが強く示唆される。1996年5月17日に出願されたNguyenらの米国特許第5,789,169号において、緑内障関連遺伝子としてT I G R（小柱網誘導グルココルチコイド応答）タンパク質をコードする遺伝子が開示された。T I G R遺伝子は、別名M Y O C遺伝子としても知られている。Nguyenらの米国特許第5,789,169号は、またそのタンパク質のc D N A配列、タンパク質自身、それに結合する分子、および結合分子をコードする核酸分子を開示しており、また緑内障および関連疾患の診断、ならびに心血管疾患、免疫疾患または該タンパク質の発現や活性に影響する他の疾患や状態といった他の疾患または状態の診断のための改善された方法および試薬を提供した。また、緑内障関連遺伝子のうちC Y P 1 B 1遺伝子における突然変異を検出し、該突然変異の存在を緑内障の指標として個体における緑内障の診断を行う方法も開示されている（特表2001-512969号公表公報）。さらに、GLC1Eとして知られる原因遺伝子に関して、Rezaie TらがO P T N（Optineurin）遺伝子を同定した。（Science. 2002 Feb 8;295(5557):1077-9.）（Genebank受入番号NM_021980）このO P T N遺伝子は過去F I P 2遺伝子として知られていた。しかしながら、当該文献においても将来における緑内障の発症リスクを予知する手段は開示されていない。

【 0 0 0 5 】

一方、W0 01/88120 A1 国際公開公報では、該公報の配列表に示すM Y O C遺伝子のプロモーター領域である-153位の遺伝子の変異を検出する方法が開示され、遺伝性が心配される家系や未発症キャリアーであることが心配される患者にお

いては、緑内障のスクリーニングとして使用することができることが示されている。しかしながら、緑内障の原因遺伝子として考えられる遺伝子は複数存在するため、単一の遺伝子の変異を検出するだけでは十分ではないことは明らかである。緑内障は潜行性であるため、視神経に対し重大な損傷が起こる前に予防また軽減する方法をとることができるように、緑内障が発生する可能性を早期に診断または効果的に予測する一層優れた方法が要望されている。

【 0 0 0 6 】

【発明が解決しようとする課題】

遺伝的に緑内障の危険因子を保有し、将来における発症リスクが高い個体を特定し、その個体に関して重点的に緑内障の検査を実施することができれば、効率的に緑内障の早期発見、早期治療をなしうると考えられる。係る状況に鑑みて、本発明は緑内障関連遺伝子と緑内障発症の関係から、緑内障の発症リスクを効果的に予知するための遺伝子の検査方法を提供する事を課題とする。

【 0 0 0 7 】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、緑内障の発症が遺伝子の変異に関与することに着目し、緑内障患者および非患者の緑内障原因遺伝子のコード領域の遺伝子配列の分析を行い、鋭意研究を重ねた結果、該遺伝子で観察される変異の頻度が患者群と非患者群で有意に異なることを見出した。さらに、この変異の有無により緑内障の有病率が一般集団の有病率と比較した場合に統計的に有意に変化することを見出し、本発明を完成するに至った。

【 0 0 0 8 】

すなわち本発明は、

1. 緑内障関連遺伝子の遺伝子領域における少なくとも1箇所以上の塩基の変異を検出し、該変異を指標として将来の緑内障の発症を予測することを特徴とする遺伝子の検査方法、
2. 緑内障関連遺伝子がオプティニューリン (OPTN) 遺伝子である前項1に記載の検査方法、
3. 該遺伝子領域が配列番号1で示される塩基配列である前項1または2に記載

の検査方法、

4. 配列番号 1 で示される塩基配列における 6 1 9 位の A から G への置換 ; 8 9 8 位の G から A への置換からなる群のいずれかを検出する請求項 3 に記載の検査方法、

5. 配列番号 1 で示される塩基配列における塩基の 1 以上の欠失を検出する請求項 3 に記載の検査方法。

6. 配列番号 1 で示される塩基配列における塩基の 1 以上の挿入を検出する請求項 3 に記載の検査方法。

7. 配列番号 1 で示される塩基配列における塩基の 2 以上の同時置換を検出する請求項 3 に記載の検査方法。

8. 緑内障が原発性開放隅角緑内障および／または正常眼圧緑内障である前項 1 ～ 7 のいずれか 1 に記載の検査方法、

9. 緑内障関連遺伝子のコード領域および／または上流領域を含む遺伝子領域の一部に特異的にハイブリッドを形成しうるオリゴヌクレオチドを用いて変異を検出することを特徴とする前項 1 ～ 8 のいずれか 1 に記載の検査方法、

1 0. 緑内障関連遺伝子のコード領域および／または上流領域を含む遺伝子領域の一部に特異的にハイブリッドを形成しうるオリゴヌクレオチドが、以下に表される配列からなるオリゴヌクレオチドの群より少なくとも 1 以上選択され、プライマー機能を有するオリゴヌクレオチド ;

1) 配列番号 1 5 から 4 0 のいずれかで表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチド。

2) 前記 1) に記載のオリゴヌクレオチドの相補鎖。

3) 前記 1) または 2) に記載のオリゴヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズしうるオリゴヌクレオチド。

4) 前記 1) ～ 3) のいずれか 1 に記載のオリゴヌクレオチドと約 60% の相同性を有するオリゴヌクレオチド。

5) 前記 1) ～ 4) に記載のオリゴヌクレオチドのうち、1 ないし数個の塩基が置換、欠失、挿入もしくは付加といった変異された塩基配列を含むオリゴヌクレオチド、

11. 前項9に記載のオリゴヌクレオチドから選択される少なくとも1のオリゴヌクレオチドを用いて核酸増幅処理方法を行うことを含む前項8に記載の検査方法。

12. 前項1～9または11のいずれか1に記載の検査方法に使用する試薬を含んでなる検査用試薬または検査用試薬キット、からなる。

【0009】

【発明の実施の形態】

発明者らは、緑内障患者および非患者において、配列番号1に示される塩基配列からなる緑内障原因遺伝子を構成する各エキソンのコード領域の遺伝子配列の決定を行った。その過程において、該遺伝子のコード領域に患者群と非患者群で頻度に差が観察される遺伝的多型が存在することを確認した。さらに、この遺伝的多型の有無の検討によって、緑内障の有病率が一般集団の有病率と比較した場合に統計的に有意に変化する事実を見出した。本発明は、上記新知見に基づいて構成される。

【0010】

（緑内障関連遺伝子）

本発明における、緑内障関連遺伝子の例としてOPTN（オプティニューリン）遺伝子が挙げられる。OPTN遺伝子の構造および配列は、図1および配列番号1に表されているとおりであって、例えば転写されタンパク質に翻訳されるコード領域および翻訳されない非翻訳領域ならびに他の要素がある。該OPTN遺伝子の塩基の位置は、配列番号1において定めた塩基番号に従う（Genbank 受入番号 AF420371、AF420372ならびにAF420373）。このOPTNタンパク質をコードする領域は、翻訳される13個のエキソンから構成される。それぞれのエキソンおよびその周辺の配列は、エキソン4の配列を配列番号2に、エキソン5の配列を配列番号3に、エキソン6の配列を配列番号4に、エキソン7の配列を配列番号5に、エキソン8の配列を配列番号6に、エキソン9の配列を配列番号7に、エキソン10の配列を配列番号8に、エキソン11の配列を配列番号9に、エキソン12の配列を配列番号10に、エキソン13の配列を配列番号11に、エキソン14の配列を配列番号12に、エキソン15の配列を配列番号13に、エキ

ソン 1 6 の配列を配列番号 1 4 に表す。また、配列番号 1 に表される O P T N 遺伝子の塩基配列と、配列番号 2 から 1 4 に表される各エキソンの塩基配列の対応は、配列番号 2 の 5 0 1 - 6 6 6 位が配列番号 1 の 1 - 1 6 6 位に、配列番号 3 の 5 0 1 - 7 0 3 位が配列番号 1 の 1 6 7 - 3 6 9 位に、配列番号 4 の 5 0 1 - 6 8 3 位が配列番号 1 の 3 7 0 - 5 5 2 位に、配列番号 5 の 5 0 1 - 5 7 4 位が配列番号 1 の 5 5 3 - 6 2 6 位に、配列番号 6 の 5 0 1 - 6 5 3 位が配列番号 1 の 6 2 7 - 7 7 9 位に、配列番号 7 の 5 0 1 - 6 0 3 位が配列番号 1 の 7 8 0 - 8 8 2 位に、配列番号 8 の 5 0 1 - 6 1 6 位が配列番号 1 の 8 8 3 - 9 9 8 位に配列番号 9 の 5 0 1 - 6 5 0 位が配列番号 1 の 9 9 9 - 1 1 4 8 位に、配列番号 1 0 の 5 0 1 - 5 9 4 位が配列番号 1 の 1 1 4 9 - 1 2 4 2 位に、配列番号 1 1 の 5 0 1 - 6 5 9 位が配列番号 1 の 1 2 4 3 - 1 4 0 1 位に、配列番号 1 2 の 5 0 1 - 6 3 1 位が配列番号 1 の 1 4 0 2 - 1 5 3 2 位に、配列番号 1 3 の 5 0 1 - 5 8 0 位が配列番号 1 の 1 5 3 3 - 1 6 1 2 位に、配列番号 1 4 の 5 0 1 - 6 2 2 位が配列番号 1 の 1 6 1 3 - 1 7 3 4 位に対応する。

【 0 0 1 1 】

(遺伝子の変異)

本発明の緑内障関連遺伝子の変異とは、O P T N 遺伝子の塩基配列中の特定位置の塩基が異なる塩基に置換されることをいう。該特定位置は、配列番号 1 に示される塩基配列の 6 1 9 位および／または 8 9 8 位から選択される位置をいう。

【 0 0 1 2 】

本発明における特定位置での具体的な塩基の置換は、配列番号 1 で示される塩基配列における 6 1 9 位の A から G への置換；8 9 8 位の G から A への置換が挙げられる。

【 0 0 1 3 】

(検査方法)

当該遺伝子の変異の検査方法は、本発明によって開示する O P T N 遺伝子の特定の変異を検出する限りにおいて、その手法は何ら限定されるものではなく、公知もしくは将来得られうる各種の方法を広く用いることができる。

被験者の O P T N 遺伝子について本発明で開示される変異を検査するために、

当該変異位置を含む塩基配列を解析する各種の方法を用いることができる。これらの方法としては、例えばサザンハイブリダイゼーション法、ドットハイブリダイゼーション法(J. Mol. Biol., 98: 503-517 (1975)等参照)、ジデオキシ塩基配列決定法(サンガー法)、DNAの増幅手法を組合せた各種の検出法[例えばPCR-制限酵素断片長多型分析法(RFLP: Restriction fragment length polymorphism)、PCR-単鎖高次構造多型分析法(Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 86: 2766-2770 (1989)等参照)、PCR-特異的配列オリゴヌクレオチド法(SSO: Specific sequence oligonucleotide)、PCR-SSOとドットハイブリダイゼーション法を用いる対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド法(Nature, 324: 163-166 (1986)等参照)]等を例示することができる。本発明によって検出すべき遺伝子変異の位置が開示され特定されている以上、当業者にとっては公知の方法を用いてその変異を検出することができる。

【 0 0 1 4 】

(検査用試料の調製)

被験者のOPTN遺伝子を解析するために、本発明の検査方法に供される検査用試料は、被験者のOPTN遺伝子を含む生物学的試料であれば良く、特に限定されない。このような生物学的試料としては、生体材料組織、手術切除組織、口腔粘膜組織等の生体から採取した組織の他、血液、血清、糞便、射出精液、喀痰、唾液、脳脊髄液、毛髪等が挙げられる。例えばブレンダーを用いて組織等の生物学的試料を破碎し、フェノール・クロロホルム法などの公知の遺伝子抽出方法で抽出したOPTN遺伝子を被検用試料とすることができる。さらに抽出したOPTNを増幅し、濃縮したものを被検用試料とすることができる。

【 0 0 1 5 】

ここで、被検用試料は、OPTN遺伝子の全長DNAでもよく、DNA断片(部分DNA)であってもよい。DNA断片が検査に供される場合には、OPTN遺伝子のコード領域を含み、少なくとも1個、好ましくは2個以上、より好ましくは3個以上のエキソンにかかる領域を含むことが必要である。当該DNA断片は、本発明の遺伝子変異の検出に利用できるもの、即ち、塩基置換の測定のために供される被験DNAとしての測定可能な塩基長を有するものであれば、特にそ

の塩基長について制限はない。そのようなDNAの塩基長として、通常10塩基長程度以上、好ましくは20塩基長程度以上のものを選択することができ、一般的には100～1000程度の、好ましくは200～300程度の塩基長からなるものが選択される。

【0016】

また、被検用試料は、DNA、DNA転写産物のいずれであってもよい。具体的には、DNAより転写されたメッセンジャーRNA（mRNA）でもよいし、さらにそのmRNAから逆転写されたcDNA、あるいは相補DNAであってもよい。本発明の遺伝子変異の検出法において採用され得る各種の操作、例えば、DNAまたはDNA断片の合成、DNAの切断、削除、付加または結合を目的とする酵素処理、DNAの単離、精製、複製、選択、DNA断片の増幅などはいずれも常法に従うことができる（分子遺伝学実験法、共立出版（株）1983年発行等参照）。またこれらは必要に応じて、適宜常法に従い修飾して用いることもできる。

【0017】

被検用試料を調製するための核酸の増幅は、例えばPCR法またはその変法に従って実施することができる（PCRテクノロジー、宝酒造（株）1990年発行等参照）。この場合、緑内障関連遺伝子の一部に特異的にハイブリッドを形成するオリゴヌクレオチド、具体的には変異にかかる上記特定位置を少なくとも1以上有する所望のDNA断片を特異的に増幅するように適宜選択したプライマー機能を有するオリゴヌクレオチドを利用することができる。

【0018】

（プライマー機能を有するオリゴヌクレオチド）

プライマー機能を有するオリゴヌクレオチドとして、例えば1）配列番号15～40のいずれかで表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、2）前記1）に記載のオリゴヌクレオチドの相補鎖、3）前記1）または2）に記載のオリゴヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、4）前記1）～3）のいずれか1に記載のオリゴヌクレオチドと約60%の相同性を有するオリゴヌクレオチド、5）前記1）～4）に記載のオリゴヌ

クレオチドのうち、1ないし数個の塩基が置換、欠失、挿入もしくは付加といった変異された塩基配列を含むオリゴヌクレオチド等が挙げられる。

【0019】

オリゴヌクレオチドは、自体公知の方法により設計することができ、例えば化学的に合成することができる。あるいは、天然の核酸を制限酵素などによって切断し、上記のような塩基配列で構成されるように改変し、あるいは連結することも可能である。具体的には、オリゴヌクレオチド合成装置（アプライドバイオシステムズ社製 Expedite Model 8909 DNA合成機）等を用いて合成することができる。また、1ないし数個の塩基が置換、欠失、挿入もしくは付加といった変異させたオリゴヌクレオチドの合成法も、自体公知の製法を使用することができる。例えば、部位特異的変異導入法、遺伝子相同組換え法、プライマー伸長法またはポリメラーゼ連鎖増幅法（PCR）を単独または適宜組み合わせ、例えば、Molecular Cloning; A Laboratory Manual、2版、Sambrookら編、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク、1989年；[ラボマニュアル遺伝子工学]、村松正實編、丸善株式会社、1988年；[PCRテクノロジー、DNA増幅の原理と応用]、Ehrlich, H.E.編、ストックトンプレス、1989年等に記載の方法に準じて、あるいはそれらの方法を改変して実施することができ、例えばUlmerの技術（Science(1983)219:666）を利用することができる。

【0020】

ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は一般に知られたものを選択することができ、その一例としては、50%ホルムアミド、5×SSC（150mM NaCl、15mM クエン酸三ナトリウム）、50mMリン酸ナトリウム、pH7.6、5×デンハーツ溶液、10%デキストラン硫酸、および20 μ g/mlのDNAを含む溶液中、42℃で一晩ハイブリダイゼーションした後、室温で2×SSC・0.1%SDS中で一次洗浄し、次いで、約65℃において0.1×SSC・0.1%SDSで二次洗浄といった条件があげられる。

【0021】

（DNAの変異の検出）

DNAの変異は、例えば、被検用試料に含まれるOPTN遺伝子の塩基配列をサンガー法により決定し、検出することができる。

1 本鎖の目的OPTN遺伝子に相補的なオリゴヌクレオチドをハイブリダイズさせ、これをプライマーとして5'から3'方向に相補鎖をDNAポリメラーゼによって合成させる。このときに使用するオリゴヌクレオチドは、例えば上記（プライマー機能を有するオリゴヌクレオチド）で説明したオリゴヌクレオチドをプライマーとして使用することができる。

【0022】

反応の基質として4種のデオキシヌクレオチド三リン酸（dNTP）のほかに少量のジデオキシヌクレオチド三リン酸（ddNTP）を塩基ごとに別々に加え、相補鎖を合成させる。ddNTPはデオキシリボースの3'位の-OH基が-H基になっているdNTPのアナログ（類似物質）で、dNTPの代わりにddNTPが取り込まれると、それ以上相補鎖が合成されなくなり、様々な長さのDNAが合成される。反応系に、例えば化学発光物質や放射性同位元素（RI）で標識したプライマーやdNTPを加えることにより、合成されるDNAを標識し、反応物を変性ポリアクリルアミドゲルで電気泳動することにより塩基配列を決定することができる。

【0023】

サンガー法に用いるDNAポリメラーゼとして、例えばクレノー（Klenow）酵素、T7ファージや好熱性細菌由来のDNAポリメラーゼなどが挙げられる。これらは共通してエキソヌクレアーゼ活性を遺伝子工学的に除いてある。当初、サンガー法では目的の遺伝子を1本鎖DNAにして用いていたが、現在では2本鎖プラスミドをそのままアルカリ変性させて用いる方法も多用されている。

【0024】

シーケンス反応はサンガー法またはサイクルシーケンス法により行うことができる。サイクルシーケンス法はサンガー法とPCRを組み合わせた方法で、鋳型DNAを1本鎖にする必要はなく、反応系にDNAとプライマー1種類、dNTPs、ddNTPs、そして耐熱性のDNAポリメラーゼを加えて行う。PCR反応中にddNTPsが取り込まれ、伸長が止まり、結果として3'末端

が同一の塩基のDNAが合成される点はサンガー法と同じである。自動シーケンサーのシーケンス反応には、プライマーを蛍光標識したDye primer法と、ddNTPを蛍光標識したDye terminator法、さらに基質のddNTPに標識したInternal-label法等がある。

【0025】

(検査用試薬および検査用試薬キット)

本発明はまた、緑内障の遺伝子検査方法に使用する検査試薬および検査試薬キットも含むものである。検査試薬としては、例えば被検試料増幅用プライマー、被検用試料の塩基配列決定用プライマー、各種ポリメラーゼ、塩基基質、標識物質など本発明の方法に使用されるあらゆる試薬のいずれであっても良い。また、検査用試薬キットは本発明の方法に使用されるあらゆる試薬のうち少なくとも2以上をキットとして使用するものであれば良い。

【0026】

【実施例】

以下、本発明の内容を実施例を用いて具体的に説明する。但し、本発明はこれらに何ら限定されるものではない。

【0027】

【実施例1】

OPTN遺伝子のDNA解析

(1) DNAの抽出

被験者から提供を受けた血液を常法に従って処理し、有核細胞よりDNAを抽出した。DNA抽出キットとして製品名「GenとるくんTM(血液用)」(タカラバイオ社製)を用い、同製品規定のプロトコールに従ってDNAを抽出した。

【0028】

(2) 鋳型DNAの増幅

得られたDNA抽出液を鋳型とし、PCR増幅用キット、製品名「LATaq(アプライドバイオシステムズ社製)」を用いてPCRにより、OPTN遺伝子の増幅を行った。

エキソン4から16までの各エキソンの配列は、Genbank受入番号NT_031849に

よって開示されており、各配列はそれぞれ配列番号 2 から 1 4 のうち、次に表される領域の塩基配列で表される。

エキソン 4	配列番号 2、	5 0 1 - 6 6 6 位
エキソン 5	配列番号 3、	5 0 1 - 7 0 3 位
エキソン 6	配列番号 4、	5 0 1 - 6 8 3 位
エキソン 7	配列番号 5、	5 0 1 - 5 7 4 位
エキソン 8	配列番号 6、	5 0 1 - 6 5 3 位
エキソン 9	配列番号 7、	5 0 1 - 6 0 3 位
エキソン 1 0	配列番号 8、	5 0 1 - 6 1 6 位
エキソン 1 1	配列番号 9、	5 0 1 - 6 5 0 位
エキソン 1 2	配列番号 1 0、	5 0 1 - 5 9 4 位
エキソン 1 3	配列番号 1 1、	5 0 1 - 6 5 9 位
エキソン 1 4	配列番号 1 2、	5 0 1 - 6 3 1 位
エキソン 1 5	配列番号 1 3、	5 0 1 - 5 8 0 位
エキソン 1 6	配列番号 1 4、	5 0 1 - 6 2 2 位

【 0 0 2 9 】

配列番号 1 5 から 4 0 の塩基配列で表されるオリゴヌクレオチドを各エキソンを増幅するためのプライマーとして使用した。各プライマーとエキソンとの位置関係は、図 2 から図 1 4 に表される。ただし、各アンチセンスプライマーは配列番号 2 から 1 4 に表される配列の相補鎖に基づく配列からなる。

【 0 0 3 0 】

エキソン 4 用プライマー

順鎖 S F 4 配列番号 1 5 ; 領域 = 配列番号 2、337-359 位

逆鎖 S R 4 配列番号 1 6 ; 領域 = 配列番号 2、828-852 位の相補配列

エキソン 5 用プライマー

順鎖 S F 5 配列番号 1 7 ; 領域 = 配列番号 3、337-359 位

逆鎖 S R 5 配列番号 1 8 ; 領域 = 配列番号 3、337-359 位の相補配列

エキソン 6 用プライマー

順鎖 S F 6 配列番号 1 9 ; 領域 = 配列番号 4、302-321 位

逆鎖 S R 6 配列番号 2 0 ; 領域 = 配列番号 4、850-875位の相補配列
エキソン 7 用プライマー

順鎖 S F 7 配列番号 2 1 ; 領域 = 配列番号 5、261-280位

逆鎖 S R 7 配列番号 2 2 ; 領域 = 配列番号 5、765-784位の相補配列
エキソン 8 用プライマー

順鎖 S F 8 配列番号 2 3 ; 領域 = 配列番号 6、349-367位

逆鎖 S R 8 配列番号 2 4 ; 領域 = 配列番号 6、987-988位の相補配列
エキソン 9 用プライマー

順鎖 S F 9 配列番号 2 5 ; 領域 = 配列番号 7、244-263位

逆鎖 S R 9 配列番号 2 6 ; 領域 = 配列番号 7、750-769位の相補配列
エキソン 1 0 用プライマー

順鎖 S F 1 0 配列番号 2 7 ; 領域 = 配列番号 8、251-269位

逆鎖 S R 1 0 配列番号 2 8 ; 領域 = 配列番号 8、765-786位の相補配列
エキソン 1 1 用プライマー

順鎖 S F 1 1 配列番号 2 9 ; 領域 = 配列番号 9、325-344位

逆鎖 S R 1 1 配列番号 3 0 ; 領域 = 配列番号 9、834-853位の相補配列
エキソン 1 2 用プライマー

順鎖 S F 1 2 配列番号 3 1 ; 領域 = 配列番号 1 0、354-380位

逆鎖 S R 1 2 配列番号 3 2 ; 領域 = 配列番号 1 0、800-820位の相補配列
エキソン 1 3 用プライマー

順鎖 S F 1 3 配列番号 3 3 ; 領域 = 配列番号 1 1、333-350位

逆鎖 S R 1 3 配列番号 3 4 ; 領域 = 配列番号 1 1、858-878位の相補配列
エキソン 1 4 用プライマー

順鎖 S F 1 4 配列番号 3 5 ; 領域 = 配列番号 1 2、268-287位

逆鎖 S R 1 4 配列番号 3 6 ; 領域 = 配列番号 1 2、875-895位の相補配列
エキソン 1 5 用プライマー

順鎖 S F 1 5 配列番号 3 7 ; 領域 = 配列番号 1 3、326-349位

逆鎖 S R 1 5 配列番号 3 8 ; 領域 = 配列番号 1 3、735-754位の相補配列
エキソン 1 6 用プライマー

順鎖 SF 1 6 配列番号 3 9 ; 領域 = 配列番号 1 4、299-318位

逆鎖 SR 1 6 配列番号 4 0 ; 領域 = 配列番号 1 4、797-814位の相補配列

PCR反応は、94℃1分の加熱の後、94℃30秒、60℃30秒、72℃30秒のサイクルを30回実施した。

【0031】

(3) 各エキソンのDNA断片の塩基配列決定

上記PCRにより得られたDNA断片について、自動DNAシーケンサーABI Prism3100（アプライドバイオシステムズ社製）を用い、同製品規定のプロトコールに従って各エキソン毎にDNAの塩基配列を決定した。このとき、各エキソンのPCR反応に用いたプライマーのうち、順鎖プライマーと逆鎖プライマーのいずれかを用いてサイクルシーケンス反応を行った。

【0032】

(4) 対照群の各エキソンのDNA断片の塩基配列決定

さらに、対照となる非患者ボランティア群から得られた血液を上記手法に従って処理し、各エキソンのDNA断片において非患者群で多数を占める塩基配列を決定した。

【0033】

【実施例2】

(1) OPTN遺伝子の塩基配列の多型の解析1

医療機関によって開放隅角緑内障と診断された患者から得られた血液を上記実施例の手法に従って処理し、OPTN遺伝子の塩基配列を調べ、非患者群の塩基配列と比較した。

その結果を表1に示す。表1の第1行は、OPTN遺伝子のエキソン番号、第2行は各エキソンを表する配列番号、第3行は各配列における塩基位置、第4行は変異として検出された塩基の変化を示す。

その結果、配列番号5における塩基位置567すなわち配列番号1における塩基位置619、配列番号8における塩基位置516すなわち配列番号1における塩基位置898の位置において、患者においてのみ変異を認め、対照群においては変異を認めなかった。

【 0 0 3 4 】

【表 1】

エキソン	7	10
配列番号	5	8
塩基位置	567	516
配列番号1における位置	619	898
変異	A→G	G→A

【 0 0 3 5 】

【発明の効果】

以上説明したように、本発明にかかる遺伝子の変異に関する情報は、緑内障の将来における発症予測に有効である。本発明の遺伝子検査方法によりOPTN遺伝子の変異を検出することで、特に開放隅角緑内障の発症を予測することができれば、発症前の段階で発症予防または早期に治療することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

OPTN遺伝子の構造を示す図である。（実施例 1）

【図 2】

OPTN遺伝子のエキソン 4 の構造と対応するプライマーの位置関係を示す図である。（実施例 1）

【図 3】

OPTN遺伝子のエキソン 5 の構造と対応するプライマーの位置関係を示す図である。（実施例 1）

【図 4】

OPTN遺伝子のエキソン 6 の構造と対応するプライマーの位置関係を示す図である。（実施例 1）

【図 5】

OPTN遺伝子のエキソン 7 の構造と対応するプライマーの位置関係を示す図である。（実施例 1）

【図 6】

OPTN遺伝子のエキソン8の構造と対応するプライマーの位置関係を示す図である。(実施例1)

【図7】

OPTN遺伝子のエキソン9の構造と対応するプライマーの位置関係を示す図である。(実施例1)

【図8】

OPTN遺伝子のエキソン10の構造と対応するプライマーの位置関係を示す図である。(実施例1)

【図9】

OPTN遺伝子のエキソン11の構造と対応するプライマーの位置関係を示す図である。(実施例1)

【図10】

OPTN遺伝子のエキソン12の構造と対応するプライマーの位置関係を示す図である。(実施例1)

【図11】

OPTN遺伝子のエキソン13の構造と対応するプライマーの位置関係を示す図である。(実施例1)

【図12】

OPTN遺伝子のエキソン14の構造と対応するプライマーの位置関係を示す図である。(実施例1)

【図13】

OPTN遺伝子のエキソン15の構造と対応するプライマーの位置関係を示す図である。(実施例1)

【図14】

OPTN遺伝子のエキソン16の構造と対応するプライマーの位置関係を示す図である。(実施例1)

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Sysmex Corporation

<120> A check up method for Glaucoma

<130> NP02-1047

<140>

<141>

<160> 40

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1734

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

atgtcccatc aacctctcag ctgcctcact gaaaaggagg acagccccag tgaaagcaca 60
ggaaatggac cccccacct ggcccaccca aacctggaca cgtttaccac ggaggagctg 120
ctgcagcaga tgaaagagct cctgaccgag aaccaccagc tgaaagaagc catgaagcta 180
aataatcaag ccatgaaagg gagatttgag gagctttcgg cctggacaga gaaacagaag 240
gaagaacgcc agttttttga gatacagagc aaagaagcaa aagagcgtct aatggccttg 300
agtcatgaga atgagaaatt gaaggaagag cttggaaaac taaaagggaa atcagaaagg 360
tcattctgagg accccactga tgactccagg cttcccaggg ccgaagcgga gcaggaaaag 420
gaccagctca ggaccaggt ggtgaggcta caagcagaga aggcagacct gttgggcatc 480

gtgtctgaac tgcagctcaa gctgaactcc agcggctcct cagaagattc ctttgttgaa 540
 attaggatgg ctgaaggaga agcagaaggg tcagtaaaag aaatcaagca tagtcctggg 600
 cccacgagaa cagtctccac tggcacggca ttgtctaaat ataggagcag atctgcagat 660
 ggggccaaaga attacttcga acatgaggag ttaactgtga gccagctcct gctgtgccta 720
 aggggaaggga atcagaaggt ggagagactt gaagttgcac tcaaggaggc caaagaaaga 780
 gtttcagatt ttgaaaagaa aacaagtaat cgttctgaga ttgaaacca gacagagggg 840
 agcacagaga aagagaatga tgaagagaaa ggcccggaga ctgttggaag cgaagtggaa 900
 gcactgaacc tccaggtgac atctctgttt aaggagcttc aagaggctca taaaaaactc 960
 agcaaagctg agctaataa gaagagactt caagaaaagt gtcaggccct tgaaaggaaa 1020
 aattctgcaa ttccatcaga gttgaatgaa aagcaagagc ttgtttatac taacaaaaag 1080
 ttagagctac aagtggaaag catgctatca gaaatcaaaa tggaacaggc taaaacagag 1140
 gatgaaaagt ccaaattaac tgtgctacag atgacacaca acaagcttct tcaagaacat 1200
 aataatgcat tgaaaacaat tgaggaacta acaagaaaag agtcagaaaa agtggacagg 1260
 gcagtgtga aggaactgag tgaaaaactg gaactggcag agaaggctct ggcttccaaa 1320
 cagctgcaaa tggatgaaat gaagcaaacc attgccaagc aggaagagga cctggaaacc 1380
 atgaccatcc tcagggtcga gatggaagtt tactgttctg attttcatgc tgaaagagca 1440
 gcgagagaga aaattcatga ggaaaaggag caactggcat tgcagctggc agttctgctg 1500
 aaagagaatg atgctttcga agacggaggc aggcagtcct tgatggagat gcagagtcgt 1560
 catggggcga gaacaagtga ctctgaccag caggcttacc ttgttcaaag aggagctgag 1620
 gacagggact ggcggaaca gcggaatatt ccgattcatt cctgccccaa gtgtggagag 1680
 gttctgcctg acatagacac gttacagatt cacgtgatgg attgcatcat ttaa 1734

<210> 2

<211> 1166

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

tgcaagctct gcctcccggg ttacgccat tctcctgcct cagcctcccg agtagctggg 60
 actacaagcg cccaacacca agcccggcta attttttgta tttttagtag agacgggggtt 120
 tcactgtgtt agccaggatg gtctcaatct cctgacctca tgatctgtcc gcctcggcct 180
 cccaaagtgc tgggattaca ggcgtgagcc accacgcccg gccctcattg taccctttta 240
 tacaccata cacacacacg cacacacaca catgcacaca tgcgctgca cacacacaca 300
 cacttttctg aagctacata tacctttttt gtttaaaagg aagaatcaaa aatgtccaaa 360
 atgtaactgg agagaaagtg ggcaactttt ggagtaagta ttagcaatcg ccaatgggtt 420
 tgtgggactc ccggggaccc cttgtggggc gggggacagc tctattttca acaggtgact 480
 ttccacagg aacttctgca atgtcccatc aacctctcag ctgcctcact gaaaaggagg 540
 acagccccag tgaaagcaca ggaaatggac cccccacct ggcccacca aacctggaca 600
 cgtttacccc ggaggagctg ctgcagcaga tgaaagagct cctgaccgag aaccaccagc 660
 tgaaaggtga gcagggtgg cccctgtgtg cccattcat cctgggcctg caagaaatgc 720
 catccctttg cactaaggct tgggtggtgag ctcccttctc cccgtttcca taggtggtag 780
 ctggtgggga agcacaggat ttagcatttg gcaaggctaa atctgttctg atttttactt 840
 ttggaaacag gtacaagtaa aaactgtgtg tatctcaagg aagtagcata atgatattta 900
 gccattcaa aaggaaaaag aggctgggagc tgggtggctca tgcctgtcat tccatcactt 960
 tgggaggccg aggcagaagg attgcttgag tacaggagt caagaccagc ctgggcaaga 1020
 tggcaagacc tgatctctac aaaaaaatta aaaaaaaaaa aaaaaagctg ggcgtggtgg 1080
 tgcacgcctc tggtcctagc tactggggat gctgaggttg gaggattgct tgagcctggg 1140
 aagttggagc tgcagtgagc catgat 1166

<210> 3

<211> 1203

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

gcagtgagcc atgatcgtgc cactgcactt tagcctggat gacagagaga gaccctgact 60

caaaaaaaaaa aaaaaaaaaa ggaaaaagga agaaaggctg ctatggttcc agagttagtc 120
 ctatatatta ccttattaag agaaagcatc ctggtatctc aagatggctt tgggcaggac 180
 cagtatttga atctaggagt agtaagaact tccttagctc ctagtaacca tagatattta 240
 gatatttgtg ctgtagtggc ggtacccaaa tccactttat tttcttggga tttttaagga 300
 ctagaaatga tgttcatccc gctagtcttt tctgtaagca aaaaccactt cgtctttttg 360
 ctgctgaccc ttggggccaag gctaagcatg gcactcttca attcagagcc atgtggtcaa 420
 gtggactaga gggagatttg gttcatcaga tcaagtccac tttcctgggtg tgtgactcca 480
 tcactctgaa cctcctgcag aagccatgaa gctaaataat caagccatga aagggagatt 540
 tgaggagctt tcggcctgga cagagaaaca gaaggaagaa cgccagtttt ttgagataca 600
 gagcaaagaa gcaaaagagc gtctaattggc cttgagtcac gagaatgaga aattgaagga 660
 agagcttggg aaactaaaag ggaaatcaga aaggtcatct gaggtgagca gaccgatcca 720
 ttgtgatgtt gttttttttt tttcccttga catttgcagt ggaatcttac gtgtctagac 780
 tcctagatca aaacctttca tggttcagtc tggattgggtg ttttgcctgg tcttggaaga 840
 agtgcttttg ctgaaaagat tggttgccct attaagggtc atggataatc tcttttagaa 900
 gaaagaaatt tgtaaagctt tgaccgtact gattgtaggc aaaagaacag taagggtata 960
 aatcattgta ttgtattcat tatagatggt gcagatgggc ctctgcctag aaccaacaat 1020
 tgtttttagt ttgtctttga tataaaaaat atgtttaaaa aaccattac tcagaatttt 1080
 tacttgttga ccttgtctgt tctctcagtc taaaatggag attattcact ttacattttc 1140
 ctttttaaaa atgcttttga aaatgtcatg ttgtggtagg aggctatcgc attgccacag 1200
 atg 1203

<210> 4

<211> 1183

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

ttgtcctgcc tcagcctccc gagtagctgg gactacaggc gcccgccacc acgccagct 60

aatctttttg tatttttagt agagacgggg tttactgtg ttagccagga tggctccat 120
ctcctgacct tcatgatccg cccacctcg cctcccaaag tgctgggatt acaggcgtga 180
gccaccacgc ctggcttggc tttttttttt tttttttga gacagggtct tggcagtctt 240
aaactcctgg gctcaggcag tcttctgcc tcagcctccc aactaatggg gactacaggt 300
gtgtgccact acacctggct aattattaaa tttttgtaa agatgggggt cttgctatgt 360
tgcccaggct ggtctcaaaa tcttgccctc aagggtacct cccacttcag cctcccagag 420
ctctgcgatt aagggtatga gcccatgggtg cccagcctta gtttgatctg ttcattcact 480
ttactccttg tcatctccag gacccactg atgactccag gcttcccagg gccgaagcgg 540
agcaggaaaa ggaccagctc aggaccagg tggtagggt acaagcagag aaggcagacc 600
tgttgggcat cgtgtctgaa ctgcagctca agctgaactc cagcggtcc tcagaagatt 660
cctttgttga aattaggatg gctgtgagtt tttggtttta tttttgttt gagcaaacta 720
taaagcctcc cctggaaaga tgaaacaaat accacttttt cttgtcaaca caagccaagg 780
attgaggaaa ttccagtgtg gcaaagataa attggctctc attttctaag tatagcataa 840
tgcattgtaag ggttatcata gctaaaatgg aaaaatatta attacctttt atgatgaaag 900
ctgtagtctt tttttttttc ttcattcatgt cctggcaaat tgaacatttt tgtgaccaga 960
aaaggaaaaa acccacacga acatgaactt tctgtcattt ttcaaactag gtctcaaagc 1020
tgtattccgc agttcactta agggagcgca aacatatttt cacaacagaa ccctcttttt 1080
ttgttttgag acagagtctt actctgtctt cccggctgga atgcagtgat gtgatctcgg 1140
ctcactgcac cctctgcctc cgggggtcaa gagattctcg tgc 1183

<210> 5

<211> 1074

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

agtgacctgt ggtgcataca aatttctaag gggaaccaac ttggccaaga tggtagctttg 60
tgaatctcat tcacagaaac tgcctctttt ttaactttac ctcagttagt tctagcattt 120

tgcattttta aggaaggata tgtggagttg tcaccagctc tgtatgacct taaccttgag 180
 aaagagggaa ctgccaaagga aaggaggag cagataagct ttcattgttta cagagtcagg 240
 tagaatgtgt atggcgagat gaaactgacc ttcacgcctt agctgggata ttataatcc 300
 cgacagggcg tgccaggtga ggggagggtg cgtttccatt tcctctgagc caccctgttt 360
 aaacagtgc catctgaatg tttggaagct tccttgggtt gcatgtcaca aaaattcatc 420
 ttttgtcttt ttcttctttt gacaaagaat ttgtcttgta gacatattgt gttaaattccc 480
 ttgcatttct gttttcacag gaaggagaag cagaagggtc agtaaaagaa atcaagcata 540
 gtcctgggcc cagagaaca gtctccactg gcacgtatgt gaaggaagac tcgggctgtc 600
 aggcagacag gctgggcagg ctgcactg ggtgcttgtc accggaggtc aaatgttgtg 660
 acctgaggaa gtaacttctt tatgatttat accaggatct ttccagaata ttgggtttga 720
 atgctattta atgttgacg tcaaactggc aaagattaaa aactgtttgg ttctgtttg 780
 gctcacactg actgctctgt tctagtgggt tctcacctcc agcagatgaa aagtgaagc 840
 aaactggttc tcaatcaagt caatgattt ttctaatca aagacatgtt tgctcattgg 900
 ttccccgtg ccatttgacc cagaccagcc tgcccagctt ccataagtga aatattttca 960
 ttttcttttc cctgctactt cccagttata agctggcatg gccaaactg gaacatcttt 1020
 tgtaacaatg actgatagca ctctcagtca ttgtgggtgt tgccctgaaag tgcc 1074

<210> 6

<211> 1153

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

atttctctgc tctcattatt tgaaaccaca agtgaaaaag gttttctccc cttgacttaa 60
 gctgtgatgg tctctgttaa cttggagaaa ggccagtggg ctgtacaatg tgcctttatc 120
 ttttgtctga ctgcagtccc ctttgagact agatctctgg aaagcttggc accttcagcc 180
 acggctgcct ctgctgaact gttccgtgag ttttgtgggt tgggtgagg tacacagtga 240
 ctgtttggag gacgtgggtg tgtgcattgt aagctggcct ctccagagcc tcaactgagtc 300

tccacacctt ccctaggaag catggaggag cttggcactg ggggtcccag gaccagctgt 360
 gcttggtcac tagttgagaa ttagttggag aatgttctgg aaagcagttc cttaagctg 420
 gtcccagtta tattgggtta ctctcttctt agtctttgga atttttctga tgaaaacctt 480
 ttaaccttta tactgaacag ggcattgtct aaatatagga gcagatctgc agatggggcc 540
 aagaattact tcgaacatga ggagtttaact gtgagccagc tcctgctgtg cctaaggga 600
 gggaatcaga aggtggagag acttgaagtt gcactcaagg aggccaaaga aaggtatgaa 660
 ataggttaac ttgaaatatg tgttttttta aaacagcttt cctgagatat aattaagata 720
 ccatacagtt caccatttta aagtatacat ttcagtgttt tttagaatat tccaggattg 780
 tgcaaccact gttactacaa tataatttta gaacattttt tccccaaac agcactcact 840
 gtctgctcct ccaagcaatg tgctttctgt ctctatagat ttggccattc tagacatttc 900
 atataaatgg aattatacag tctgtggttt tttgtgactg gcttctttca cgtagcataa 960
 tgtttttgag gttcatctac aacgtagcat gtatcagtac ttccttttcc ttgctgaata 1020
 acctccatt gtctatatat acaacatttt gtttattcat tcatcagttg ataaacatta 1080
 gagttgttgc cactttttac ctattaggaa taatgctgct atgaacagtg tgtacaagtt 1140
 tttactggga tat 1153

<210> 7

<211> 1103

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

ccacagtctc ttgtttcatt tggattggga cggctttcct gtggttatga tttggtgtta 60
 agaatggtgt tacttttttt gttgtcgttt attcggtagc ttttaaacct agctgtgtcc 120
 taaaaggaaa agtctttcct tctctaata gaattctatga atgagatacc atgttcatgg 180
 aacacacatg catccacatg tgtaaacaca aacaatttca aaaacattgc tgcataaggac 240
 agttgcatgg aaacaaatgg tgttcaagat gagtttcact tgccttttac ctctgtgtgt 300
 atttgtctgt gaatcaattc tagccaattt taggatgaaa aataaaacta atgctaatat 360

agtgaatgtg tagagatttt gaaaaccct gatcctttat cccaattgta aacaatgttc 420
 tttttagtag ttctgtaata attgctatct ctcttaaagc caaagagaaa gtaacttttc 480
 tatcttctgt gattttccag agtttcagat ttgaaaaga aaacaagtaa tcgttctgag 540
 attgaaacc agacagaggg gagcacagag aaagagaatg atgaagagaa aggcccggag 600
 actgtgagtc ctaagattcc acggccacta ccacaccac acacacgaga gtagtccagc 660
 cactgaattc aaatcttgtg atgggttatt tgcttttaga atatagaaat catgttgata 720
 ttgaatatta tctatctatt ccttttatat gtccttgctc tgctctgtgt caattgtagc 780
 gagatgtatt tcttttttgt tgttgttgtt ggagatggag tctcactctg tcgccaggct 840
 ggagtgcagt ggcacgatct cagctcactg caacctccgc ctcccagggt caagcagttc 900
 tcctgcctca gcctcccaag tagctgggat tacaggtgcc cgtcaccacg cctggctaata 960
 ttttgtattt ttaatacaga cagggtttca ccatgttggc caggatgggc ttgatctctt 1020
 gacctcgtga tcctcccacc tcggcctccc agagtgtctg gattacagat atgagccact 1080
 gcgcccagct gcaagatgta ttt 1103

<210> 8

<211> 1116

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

acgaattcaa cagccagtag cagggaata tggcttttca aggcatcaga aactcattta 60
 caaaaattat agagctgcca ggaaaaaggc tgcacaacaa aaatagttga gtaaaactaga 120
 aacatacact gggaagagag tatgggggca agttgttagc tggatagata ggactgtgct 180
 ttgacacctc tgtggtctat gatctctgaa cctggaatag ggttcatttt aatagcgata 240
 aagtcattat ccagtgcat ccaaattgat tagttcatgc tttattagga aacagaagtt 300
 acccaaaact tagcaaacct aagtaccaag tatccaaaac attcttttcc tacacaatgt 360
 ttgggggtatt gtcaaagttg gattgattca ccagccagtc ttaattggct actaatgggt 420
 cagcctgttt tctcctaaag aggtttgttt aatgtcagat gataattgta cagatatgtt 480

tgggatttcc cgtatgatag gttggaagcg aagtggaagc actgaacctc caggtgacat 540
 ctctgtttta ggagcttcaa gaggctcata caaaactcag caaagctgag ctaatgaaga 600
 agagacttca agaaaagtaa gaatgagaga gcaattttat cctcctttga aatatacatt 660
 ttacaaagt atactactat ataaaaacat agttttttta ctatgttatg actaaaagaa 720
 aaatagacac ctaattaaaa tataaattca gaatatacta atgttccagt taatgtgtga 780
 gcatgaaata cttgtaagat ggggggttgg ggactggaga actttaattc tgccatttag 840
 gggcatttgt taaatgtacg agcctgggta agatctctac agtaaagctg tgagctagtt 900
 ttcctgttac tgacttaagc tgatgacatt gatgtgagta agcataaaga aagatgaaaa 960
 gagcataaag atcttgagtg acatttattt ggaaaaaggt caatttcaat ttgttatttc 1020
 aatcagttaa ttatttcagg ctaacatgta gattgagcgt ttggcatttg cttgtttctc 1080
 ttgatgtaag aagttaccca aaacttagca aaccta 1116

<210> 9

<211> 1150

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

atgctttgtg catagctgtc atttatttgt attatattga aatcctcttt ccgatcttta 60
 agaagactta ggggaacttc ctttttcctt tattgaatct ttgtcagaaa ctaaagtctt 120
 tgcaattgac agaacctata actttttttt taatataaaa gatatccaca catcactaca 180
 tgagaagcgc cttagctaata tactactgtg gtctgtgttt aaatactaaa aatgtatctg 240
 tatgactagt ttaaacaatt attcaaagag gacagtactg catgtgagct tagatctgta 300
 cttttttatg tttaggcgta agggttcaga aatatggcca ggtctagtga agaagcaagg 360
 aggattatgt atttcatttt gcattcataa accctacagc cctaaaattc ttatattgta 420
 cataaccttg gggtttgttt aaaagccact gcgacgtaaa ggagcattgt ttatcctcat 480
 gaaatcttga cttttcttag gtgtcaggcc cttgaaagga aaaattctgc aattccatca 540
 gagttgaatg aaaagcaaga gcttgtttat actaacaaaa agtttagagct acaagtggaa 600

agcatgctat cagaaatcaa aatggaacag gctaaaacag aggatgaaaa gtgagtatgt 660
 tgagtcagaa gggcagcgac ggggcagagg agggagaatc gcctttttat acagattgga 720
 attcggattt gagaataaat tttaaaaaat ttctttttca cttatctgaa ggagtcctag 780
 cagacctctc agagagggggg ataaaattta aaagttttgt cataataaaa ttatgctgat 840
 tgtttgact ctgtcttgat ttttcagaaa agattttttt tgagagtaag aaatgctagt 900
 aggtcgtggg gtgataaagg taggcgagaa gatttttcta ctggagtgtt cagaaggttg 960
 ggaggcaaga ctataagttt ctatgatatt ttccccagga ttccattttt taatatcttt 1020
 tttaataggt ccaaattaac tgtgctacag atgacacaca acaagcttct tcaagaacat 1080
 aataatgcat tgaaaacaat tgaggaacta acaagaaaag aggtattcac tgaaaaaaat 1140
 tacttcata 1150

<210> 10

<211> 1094

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

gcaattccat cagagttgaa tgaaaagcaa gagcttgttt atactaacia aaagttagag 60
 ctacaagtgg aaagcatgct atcagaaatc aaaatggaac aggctaaaac agaggatgaa 120
 aagtgagtat gttgagtcag aagggcagcg acggggcaga ggaggagaaa tcgccttttt 180
 atacagattg gaattcggat ttgagaataa attttaaaaa atttcttttt cacttatctg 240
 aaggagtcct agcagacctc tcagagaggg ggataaaatt taaaagtttt gtcataataa 300
 aattatgctg attgtttgca ctctgtcttg atttttcaga aaagattttt ttgagagta 360
 agaaatgcta gtaggtcgtg gggtgataaa ggtaggcgag aagatttttc tactggagtg 420
 ttcagaaggt tgggaggcaa gactataagt ttctatgata ttttccccag gattccattt 480
 tttaatatct tttttaatag gtccaaatta actgtgctac agatgacaca caacaagctt 540
 cttcaagaac ataataatgc attgaaaaca attgaggaac taacaagaaa agaggtattc 600
 actgaaaaaa attacttcca tagcctagta atgaacagaa actgttgaac gttttgtata 660

taaaatagtt acatgaatcc ttcactaaat ctggtttcaa aggttgtttt ccaatgtatc 720
 attatttctt gcatctaggg ttgttaactt ctgatgttcc acatatgtgt aatgtgcttt 780
 attgcgtaca aagatgatgt gaatgtccta tggtcaggga ttaagcactt cgtatttctt 840
 tttttttttt tttagagacgg agtctcgctc tgtcgcccag gctggagtgc agtggcgcga 900
 tctcggctca ctgcaagctc cgcctcctgg gttcacgcca ttctcctgcc tcagcctccc 960
 gagtagctgg gactacaggg gcccgccacc gcgcccggct aattttttgt atttttagta 1020
 gagacggggt ttcaccttgt tagccaggat ggtctcgatc tcctgacctc gtgatccacc 1080
 cgctcggcc tccc 1094

<210> 11

<211> 1159

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

gtgctgggat tacagggtgtg agccatcatg cccagcagta gtgttctct cttggaccta 60
 ataattttaa atttaaaaca tgtttcttct tttccactga ctgcaggaag taacaagtgg 120
 caaaataaca gtatcaacga gtcacagcct tattaacatt ggagtttggt attgtatccc 180
 tgatttcggg gttatcacct tttttttagg aattcattat ttgcaagcca caacttaaat 240
 acaactttct gaataagtta gcgttgctga ttaatagact ggtagagct gatacathtt 300
 ttagatctcg ctatgttgcc caggcttgtc tcccactcct gggctcaaac gatcctccca 360
 cctcagcctc tcaattctag gcatgagcca ccacaccgg ccagagctga taattaaaaa 420
 aataaacctt tttctaatat ttactaaaa caggcagaat tatttcaaaa ccatttctag 480
 aataaatgtt tctttttcag tcagaaaaag tggacagggc agtgctgaag gaactgagt 540
 aaaaactgga actggcagag aaggctctgg cttccaaaca gctgcaaatg gatgaaatga 600
 agcaaaccat tgccaagcag gaagaggacc tggaaaccat gaccatcctc agggctcagg 660
 tgaggcacct tccaaaacc cagctgagcg aggccagccc tgactgtatt ctgcattgg 720
 aaagcaatgg tgtttagaat gtttgaatt ttctatttta tatatttttt caccctgag 780

tgtattaaaa ctttaaaatt gaaacatttg gaaagtgtc agtggatctt atctgttcta 840
 catttaatag gtaattggat tctttccagt ttgtggcatt atgattaacg ttgctaagac 900
 attcctgtgc atgttgctct gttcacatgt ggatatttta tatttctgtt gggtacacac 960
 ctaggagtgg agtcgctgga tcataggctc tgcattgttac tcacttttaa caggtaatgc 1020
 caaacagttt tccagagtgg ttggaccagt tttcactccc atcaacagag agtttccatg 1080
 gctctacatc ttaccaacac ttctattatc agtcattttc ctttaaccac tctggagggt 1140
 atatagtgg atctcattt 1159

<210> 12

<211> 1131

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 12

tttcataagg taaaataaga tagtaaattg aaagcaccca acataggacc tcacacatgt 60
 ttggaattta acaaataagca tctattttgt atgattattc ttttaaatgt agcttaagac 120
 cagccttcat aaatacacct ggcagaatca atttactata ttaagtaatc atttactata 180
 ttaagttgat cctgaattgt ttattatcta aaagtccaga taattttgct gaattaatgg 240
 tacctacagt attttaaacta cctatatcag tgcagttgca ggattttgtg tgtttaaagc 300
 acacacacaa acacagcttg tatctgctat cggaatgtac ctggaaagtc atggtcatta 360
 tactgttttc tagcaggatt gtgcatctgt gattcacaag ggctattgaa ggatacagca 420
 ctacctctc atcgcataaa cactgtaaga atctgcattc atctaggtag taacttctgt 480
 atcttttttt cctctaacag atggaagttt actgttctga ttttcatgct gaaagagcag 540
 cgagagagaa aattcatgag gaaaaggagc aactggcatt gcagctggca gttctgctga 600
 aagagaatga tgctttcgaa gacggaggca ggtaaggaaa agagagagga ggaccagag 660
 ctcacatcag catggccgta gaagagggtc ctgtccaaag acgttcctga tttgaactat 720
 aagaatagct gtgttcgcgc cactgcactc ctccctaggt acagagcga gtcccctgtc 780
 tgaaaaataa ataataataa taataattgc ttcatttaca cttcatgtga tcatgttccc 840

aacacttagt ttgtcttaca ggaaagcttg acagagactt gtgggagctt gatcaagctc 900
 cttgctttta gataagcaag gattttgatt tgattttaaa atgttggtt gttttgtttt 960
 gttttttgag gcagggtctc actcctgtca cccaggctgg agtgcagtgg catgatcatg 1020
 gttcactgca gcctcaactt cctgagctca ggtgatcctc gtgcctcagc ctcccagta 1080
 gctggaacta caagtgcag ccaccatgca cttgtaacaa taatgttacg t 1131

<210> 13

<211> 1080

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 13

accttgtgct gttaggaatt tggtaggttag cttcccatc tattttatac tttacatat 60
 cacatacaca cttacctata tcatatctca aaaccagata atattgattt ctctgtgttt 120
 aagttacaaa atgatcactg taggtattgt tctgcagctt actttacata atattatgat 180
 tttgagctct cttgatatgt gcggatgtaa tttattatac ttcatgtctg tattttgatt 240
 tataaatatg ccacttcttt ctaatctgtt tcctactgat gacagtttg tttttcctg 300
 atttttttta actgtaatta tttactttca ctagtctcct agtgccaata gtatttaaaa 360
 ctaaaattag tctggttttt atgaacctg gcagtgtagt ttgagtcttt tttccctac 420
 ttctgtggac tgtctgtca gtgtgtcat gtttcggggt tgtagaacat cacacagcgt 480
 gttgcttttc gtcctggcag gcagtccttg atggagatgc agagtcgtca tggggcgaga 540
 acaagtgact ctgaccagca ggcttacctt gttcaaagag gtgagtcctg tgtgatcctg 600
 gattttcagg aaatagctat cctatgaaaa agatgcttga agaaaaattc cacttcattc 660
 tctacaatgg attccaaatc aaggcaccaa aaatatagca cccgtcagtc tcattaccac 720
 agcactccca tctccatcca ttaccaccg aatccagacc agacccttca cctgccaga 780
 aggtgcctgg caggccaca cttttcttt tttttcttt tttttgagac agaatttcgc 840
 tgtgtcgtcc aggctggagt gcagtggcga gatctcggct cactgcaacc tccacttct 900
 gtgttcaaac ggttctcctt ccacagcctc ccgagtggct ggaattacag gcgtgcaccg 960

ccacacccag ctaatTTTTg tatttttaat agagatgggg tttcacCGtg ttggccaggc 1020
 tggTctcgaa ctctgacct caactaacct gcctgtctcg gtctcccaaa gtaccgggat 1080

<210> 14

<211> 1122

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 14

catgccagta atcctagcac tttgggaggc caaggtgggc agatcatgag gtcaggagtt 60
 cgagaccagt ctggccaaca tggcaaaacc acatctctac taaaaataca aaaattagct 120
 gggcgTggtg gcgcgcacct gtgatccag ctactcagga ggccaaagca ggaggatcac 180
 ttgaacctgg gaggcggagg ttgcagtgag ccaagatcgt gccactgccc tccagcctgg 240
 gtgacagcga gactccgtct caaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaatccta aaataatagg 300
 gaagcaggta tcacttgag agatTTTTct ctatgtgcat cgtgatgact tcagttaaag 360
 accaaacacc tgtgtcatg tcccactacg tgttgaatac gaagtTgaac tgatgttaaa 420
 actcgccatc tgttcttcaa gtgaaacaaa cacaactgcc tgcaaaatgg aactaatgga 480
 attatcatac ttattccag gagctgagga cagggactgg cggcaacagc ggaatattcc 540
 gattcattcc tgcccaagt gtggagaggt tctgcctgac atagacacgt tacagattca 600
 cgtgatggat tgcattttt aagtgttgat gtatcacctc cccaaaactg ttggtaaatg 660
 tcagatTTTT tctccaaga gttgtgcttt tgtgttattt gttttcactc aaatattttg 720
 cctcattatt cttgttttaa aagaaagaaa acaggccggg cacagtggct catgcctgta 780
 atcccagcac tttgggaggt cgaggtgggt ggatcacttg gggtcagggt ttgagaccag 840
 cctggccaac atggcggaac cctgtctcta ccaaattac aaaaattagc cgagcatggt 900
 ggcgcagtcc tgtagtgcga gctactcgcg aggttgaggc aggagaattg cttgaaccca 960
 ggaagtggca gttgcagtga gccgagacga caccactgca ctccagcctg ggtgacagag 1020
 ggagactctg tctcgaaaga aagaaagaaa aaaaggaagg aaggagaagg aaggaaggag 1080
 aagaaaaggT acctgttcta cgtagaacac ctttggtgga gt 1122

<210> 15

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA
based on OPTN gene

<400> 15

aaggaagaat caaaaatgtc caa

23

<210> 16

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA
based on OPTN gene

<400> 16

acctgtttcc aaaagtaaaa atcag

25

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA
based on OPTN gene

<400> 17

gaaatgatgt tcatcccgt

20

<210> 18

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA
based on OPTN gene

<400> 18

cccttaatag ggcaaccaat c

21

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA
based on OPTN gene

<400> 19

tgtgccacta cacctggcta

20

<210> 20

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA
based on OPTN gene

<400> 20

tttttcatt ttagctatga taaccc

26

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA

based on OPTN gene

<400> 21

gaaactgacc ttcacgcctt

20

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA

based on OPTN gene

<400> 22

gagccaaaca ggaaccaaac

20

<210> 23

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA

based on OPTN gene

<400> 23

aggaccagct gtgcttggt

19

<210> 24

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA
based on OPTN gene

<400> 24

gctacgttgt agatgaacct ca

22

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA
based on OPTN gene

<400> 25

tgcattgaaa caaatggtgt

20

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA
based on OPTN gene

<400> 26

cacagagcag gacaaggaca

20

<210> 27

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA
based on OPTN gene

<400> 27

cccagtgcat ccaaattga

19

<210> 28

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA
based on OPTN gene

<400> 28

tcatgctcac acattaactg ga

22

<210> 29

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA
based on OPTN gene

<400> 29

ttcagaaata tggccaggtc

20

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA
based on OPTN gene

<400> 30

cagagtgcaa acaatcagca

20

<210> 31

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA
based on OPTN gene

<400> 31

gagagtaaga aatgctagta ggtcgtg

27

<210> 32

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA
based on OPTN gene

<400> 32

tccctgacca taggacattc a

21

<210> 33

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA
based on OPTN gene

<400> 33

ccactcctgg gctcaaac

18

<210> 34

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA
based on OPTN gene

<400> 34

tgccacaaac tggaaagaat c

21

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA
based on OPTN gene

<400> 35

cagtgcagtt gcaggatttg

20

<210> 36

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA
based on OPTN gene

<400> 36

tgatcaagct cccacaagtc t

21

<210> 37

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA
based on OPTN gene

<400> 37

tttcactagt ctcctagtg c caat

24

<210> 38

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA
based on OPTN gene

<400> 38

gattcgggtgg gtaatggatg

20

<210> 39

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA
based on OPTN gene

<400> 39

gggaagcagg tatcacttgg

20

<210> 40

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA
based on OPTN gene

<400> 40

atccacccac ctcgacct

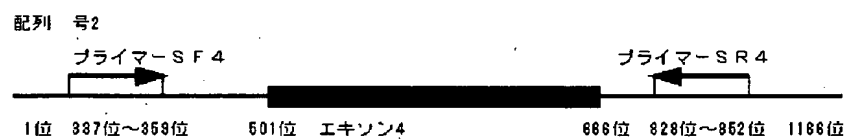
18

【書類名】 図面

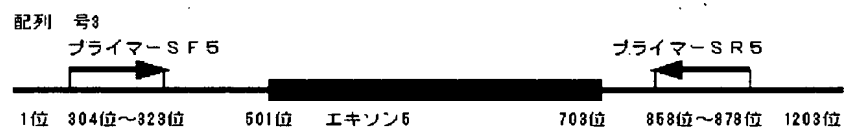
【図 1】



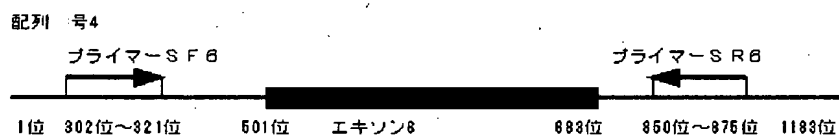
【図 2】



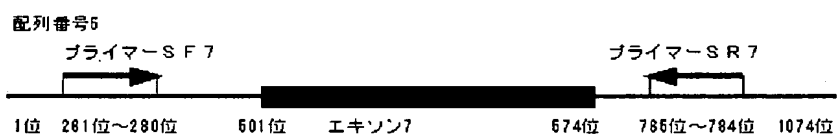
【図 3】



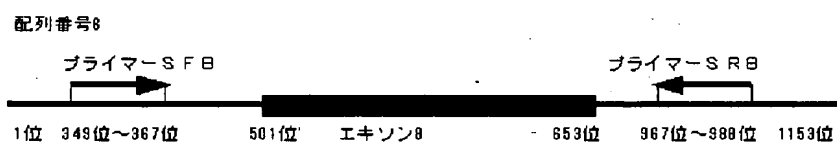
【図 4】



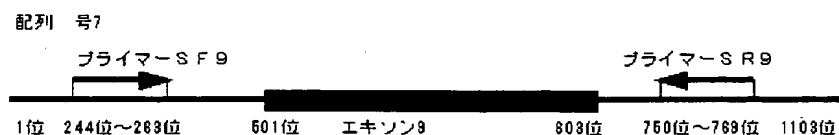
【図 5】



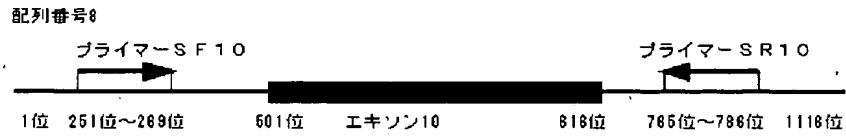
【図 6】



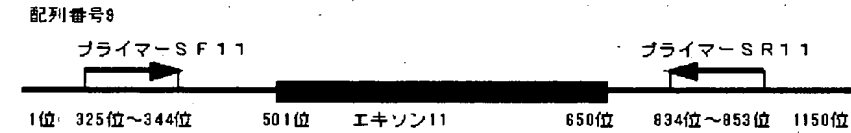
【図 7】



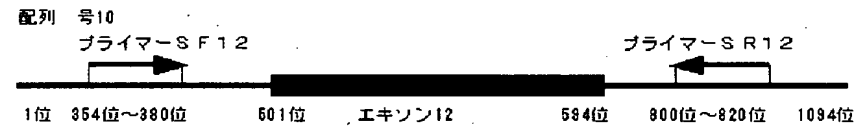
【図8】



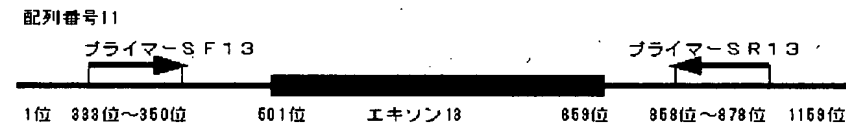
【図9】



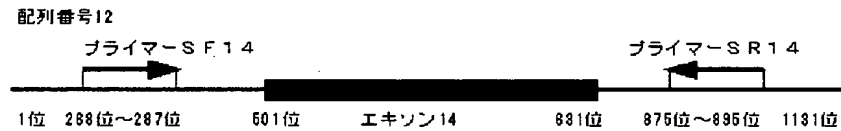
【図10】



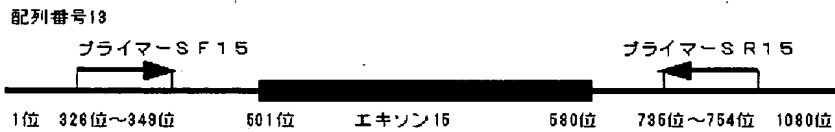
【図11】



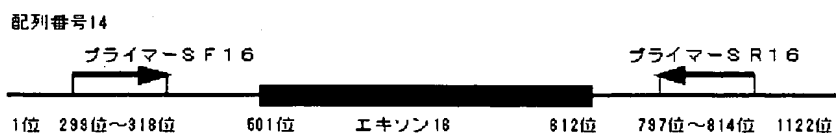
【図12】



【図13】



【図14】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 緑内障関連遺伝子と緑内障発症の関係から、緑内障の発症リスクを事前に予知するための遺伝子の検査方法を提供する。

【解決手段】 緑内障関連遺伝子のコード領域を含む遺伝子領域における塩基の変異を指標として将来の緑内障の発症を予測する。変異の位置が配列番号1で示される塩基配列における619位および／または898位の位置の変異を検出することによる。具体的には、619位のAからGへの変換、898位のGからAへの変換を検出することによる。

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2002-226612
受付番号	50201151790
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成14年 8月 5日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成14年 8月 2日
-------	-------------